

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP

INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

SAMANTA MAURILIO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA)  
EM ADSORVENTES DE QUITOSANA/ALGINATO EPOXILADOS:  
AVALIAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO E PARÂMETROS  
TERMODINÂMICOS**

Diadema, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

SAMANTA MAURILIO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA)  
EM ADSORVENTES DE QUITOSANA/ALGINATO EPOXILADOS:  
AVALIAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO E PARÂMETROS  
TERMODINÂMICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como exigência parcial para a obtenção do grau  
de Bacharel em Engenharia Química, ao  
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e  
Farmacêuticas da Universidade Federal de São  
Paulo – Campus Diadema

Orientador: Prof. Dr. IGOR TADEU LAZZAROTTO BRESOLIN

Diadema, 2018

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin pela orientação, dedicação, compreensão e amizade oferecidos ao longo de todo o trabalho.

A todos os amigos, colegas e familiares que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.

À Universidade Federal de São Paulo e a todos os discentes pela oportunidade concedida.

O meu muito obrigado.

*“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”*

*Aristóteles*

## RESUMO

As proteínas são bioprodutos resultantes da indústria biotecnológica que se destacam por suas propriedades enzimáticas e terapêuticas. A albumina, proteína com grande valor comercial, vem sendo amplamente utilizada e um dos grandes desafios é aperfeiçoar os processos de isolamento desse composto buscando um grau de pureza alto e o menor custo possível. Uma das competências da albumina é sua tendência de ligação reversível com diversos ligantes. Existem diversos fatores que afetam essa interação, como, por exemplo, força iônica, viscosidade, pH e temperatura. Este trabalho teve como objetivo estudar a interação da albumina de soro bovino (BSA) em adsorventes de quitosana/alginato epoxilados, buscando-se avaliar o comportamento em diferentes temperaturas e pHs. Para a avaliação dos parâmetros de adsorção e termodinâmicos, nos experimentos com corantes a adsorção foi estudada nas temperaturas de 25 e 35°C utilizando o tampão biológico fosfato de sódio e MOPS.

***Palavras-chave:*** albumina, matriz de quitosana/alginato, isotermas de adsorção.

## **ABSTRACT**

Proteins are bioproducts resulting from the biotechnology industry that stand out for their enzymatic and therapeutic properties. Albumin, a protein with great commercial value, has been widely used and one of the great challenges is to improve the isolation processes of this compound, seeking a high degree of purity and the lowest cost. One of its competencies is the tendency to bind reversibly with various binders. There are several factors that affect this interaction, such as ionic strength, viscosity, pH and temperature. The objective of this study was to study the interaction of bovine serum albumin (BSA) in epoxylated chitosan/alginate adsorbents, aiming to evaluate the behavior at different temperatures and pHs. To evaluate the adsorption and thermodynamic parameters, in adsorption experiments the adsorption was studied at temperatures of 25 and 35° C using the biological phosphate buffer and MOPS.

***Key words: Albumin, chitosan/alginate matrix, adsorption isotherms.***

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1. Proteínas.....	12
3.2. Albumina.....	14
3.3. Adsorção.....	15
3.4. Modelos de adsorção.....	16
3.5. Termodinâmica da Adsorção.....	19
3.6. Quitosana.....	20
3.7. Alginato de Sódio.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. Materiais.....	22
4.2. Métodos.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Isotermas de adsorção.....	24
5.2. Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	28
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos aminoácidos (Adaptado de TORRES, 2006). .....	12
Figura 2: Composição de um polipeptídeo (tetrapeptídeo) (ARAUJO, 1996). .....	13
Figura 3: Estruturas fundamentais das proteínas (ARAUJO, 1996). .....	13
Figura 4: Estruturas padronizadas da proteína BSA (Adaptado de TORRES, 2006). .....	15
Figura 5: Estrutura linear (a) e tridimensional (b) da quitosana. (Torres, 2006) .....	20
Figura 6: Isotermas de adsorção de albumina em tampão biológico fosfato de sódio em pH 6,15 e T=25°C (A), pH 6,15 e T=35°C (B), pH 7,5 e T=25°C (C) e pH 7,5 e T=35°C (D). ..	24
Figura 7: Isotermas de adsorção de albumina em tampão MOPS em pH 6,15 e T=25°C (A), pH 6,15 e T=35°C (B), pH 7,5 e T=25°C (C) e pH 7,5 e T=35°C (D). .....	26
Figura 8: Gráfico de Van't Hoff para adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato utilizando tampão fosfato de sódio. ....	29
Figura 9: Gráfico de Van't Hoff para adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato utilizando tampão MOPS. ....	29



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da BSA (TORRES, 2006).....	14
Tabela 2: Modelos de adsorção definidos por Giles, 1974 (TORRES, 2006).....	16
Tabela 3: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin aos dados de adsorção de albumina humana em matriz de quitosana/alginato e tampão fosfato de sódio. ....	25
Tabela 4: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin aos dados de adsorção de albumina humana em matriz de quitosana/alginato e tampão MOPS.....	27
Tabela 5: Valores de $\Delta G_{max}$ para a adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato para os tampões MOPS e fosfato de sódio.....	28
Tabela 6: Valores de $\Delta H^{\circ}$ para a adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato para os tampões MOPS e fosfato de sódio. ....	30
Tabela 7: Valores de $\Delta S$ para a adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato para os tampões MOPS e fosfato de sódio. ....	30

## 1. INTRODUÇÃO

As proteínas são bioprodutos resultantes da indústria biotecnológica que se destacam por suas propriedades enzimáticas e terapêuticas. Essas proteínas podem ser obtidas a partir de diversas fontes como extratos biológicos e processos como a fermentação. Elas se constituem em compostos macromoleculares, formados pela associação de aminoácidos e possuem pesos moleculares que podem variar de alguns milhares até a ordem de alguns milhões de daltons. As necessidades recentes de isolamento e recuperação em grande escala desses compostos têm trazido inovações importantes nas operações unitárias necessárias para os esquemas de tratamento e purificação de proteínas, envolvendo em geral, uma sequência extensiva de etapas, o que acarreta custos elevados (ARAUJO, 1996).

A quitosana é um aminopolissacarídeo obtido da desacetilação alcalina da quitina. É crescente a importância da quitosana como adsorvente em processos de recuperação e/ou purificação de bioprodutos de alto valor agregado, como as proteínas. Uma vantagem dessa utilização está na disponibilidade da quitosana na natureza por meio da quitina, podendo ser encontrada, facilmente, como subproduto da indústria pesqueira. Outra característica importante da quitosana está na possibilidade de modificações estruturais de modo a obter diversas formas de interação química e resistência mecânica. Como a quitosana é solúvel em soluções ácidas, é possível a sua moldabilidade na forma desejada. Devido à presença de grupos amino na sua superfície, a quitosana possui propriedades policatiónicas quando em solução ácida. Com isso, apresenta em pHs abaixo do seu ponto isoelétrico ( $p.I = 6,5$ ) grupos amino na forma protonada. Nessas condições fica com sua superfície carregada positivamente e adsorve preferencialmente proteínas com  $p.I. < 6,5$ . Já em pHs acima do seu ponto isoelétrico, adsorve preferencialmente proteínas com  $p.I. > 6,5$ . (VASCONCELOS, 2007)

Aproveitando essas características, decidiu-se estudar a interação da albumina de soro bovino (BSA) em adsorventes de quitosana/alginato epoxilados, buscando-se avaliar o comportamento em diferentes temperaturas e pHs.

## 2. OBJETIVOS

Esse trabalho de pesquisa tem como objetivo o estudo da interação de albumina de soro bovino (BSA) em adsorventes de quitosana/alginato epoxilados. Para que este objetivo possa ser atingido em cada condição experimental (pH e temperatura), serão realizadas as seguintes etapas:

- Obtenção dos dados cinéticos da adsorção, para definir o tempo de equilíbrio;
- Obtenção dos dados de adsorção no tempo de equilíbrio;
- Obtenção das isotermas de adsorção em diferentes temperaturas e variando-se o pH;
- Ajuste aos modelos clássicos de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin;
- Estimativa dos parâmetros termodinâmicos.

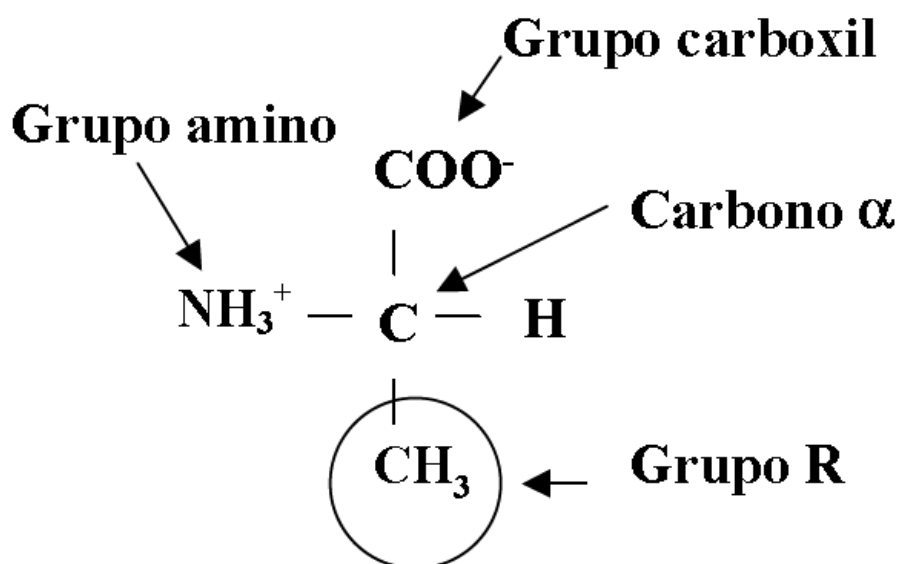
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Proteínas

As proteínas correspondem ao principal componente dos organismos vivos. São compostos formados por polímeros de aminoácidos e possuem alto valor nutricional, fazendo reações essenciais para a vida. Seu tamanho pode variar de 6KDa até 1000KDa e são caracterizadas por suas longas cadeias.

O fator comum entre todas as proteínas são os aminoácidos. Sua estrutura geral (Figura 1) é formada por grupos amino e carboxílico que estão ligados ao carbono- $\alpha$  da cadeia (TORRES, 2006).

**Figura 1: Estrutura dos aminoácidos (Adaptado de TORRES, 2006).**



A Figura 2 mostra a composição de um típico polipeptídeo (tetrapeptídeo) constituintes das proteínas e que são responsáveis pelas suas estruturas fundamentais, podendo ser elas primárias, secundárias, terciárias ou quaternárias (Figura 2).

Figura 2: Composição de um polipeptídeo (tetrapeptídeo) (ARAÚJO, 1996).

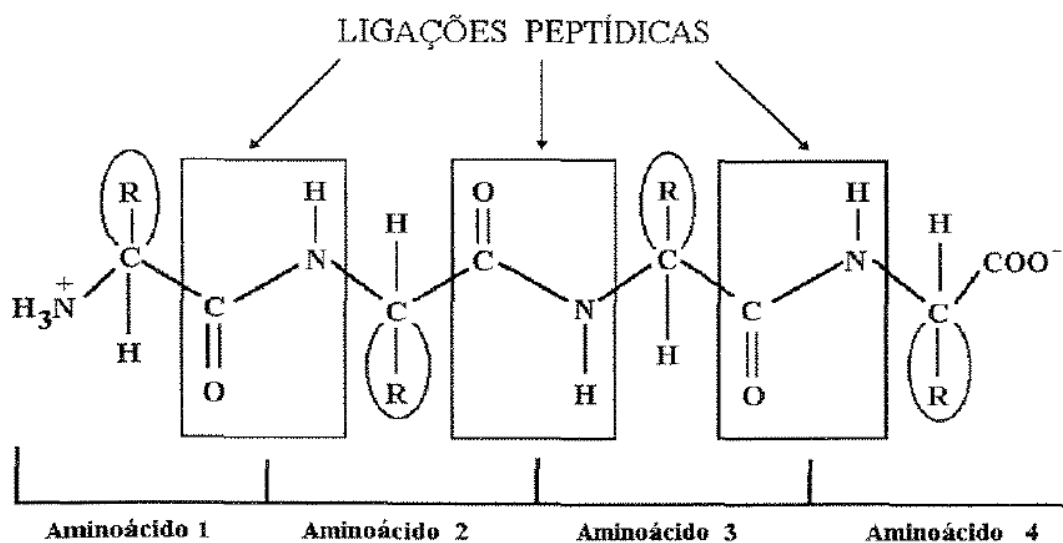
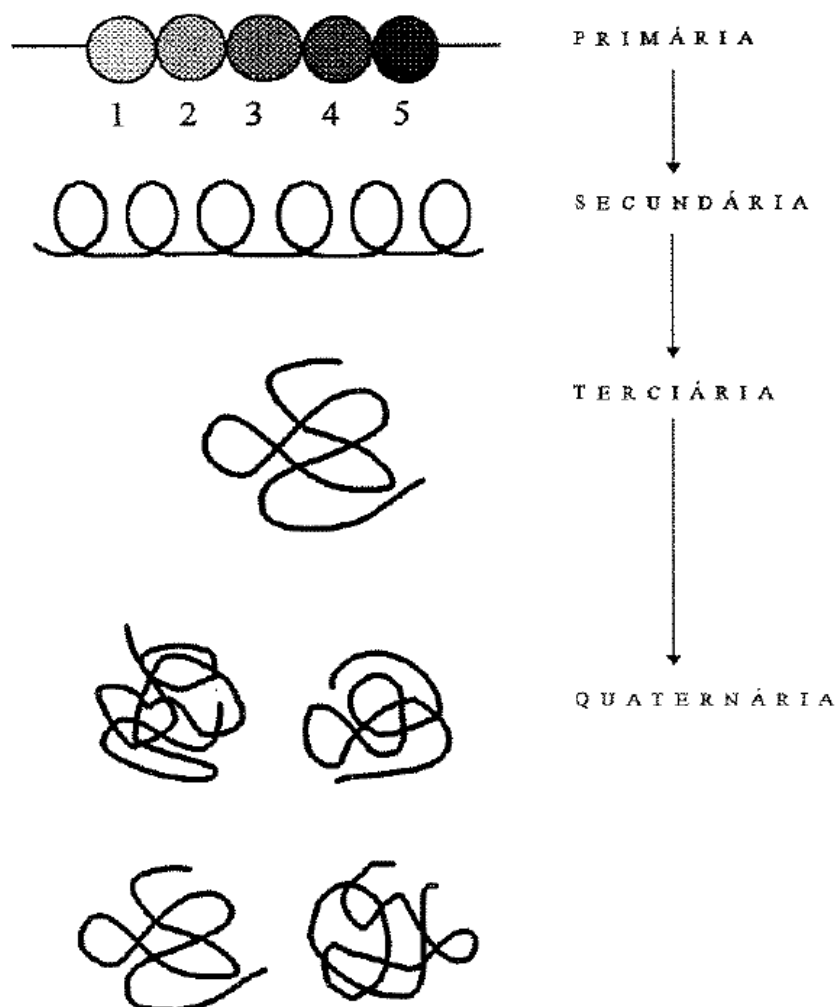


Figura 3: Estruturas fundamentais das proteínas (ARAÚJO, 1996).



Na estrutura primária um grupo carboxila é ligado a um aminoácido por ligações peptídicas. A secundária possui arranjo regular, devido às cadeias polipeptídicas, que sofrem o enovelamento na estrutura terciária. Esta, por sinal, torna-se mais compacta, sendo criada por resíduos de aminoácidos. Já na estrutura quaternária as interações hidrofóbicas fazem com que os polipeptídeos se acoplem em várias cadeias formadas por subunidades (ARAUJO, 1996).

A diferença entre os aminoácidos está no grupo R das cadeias proteicas, que variam em tamanho, estrutura, carga elétrica e solubilidade (TORRES, 2006). Os aminoácidos podem ser apolar (hidrofóbicas), polar carregada (hidrofílica) ou polar não carregada e o que caracteriza cada uma delas é a sua cadeia lateral (ARAUJO, 1996). Sua solubilidade é determinada pelo solvente e as cargas positivas ou negativas presentes nas proteínas faz com que seu comportamento se aproxime aos de aminoácidos em um campo elétrico.

### 3.2. Albumina

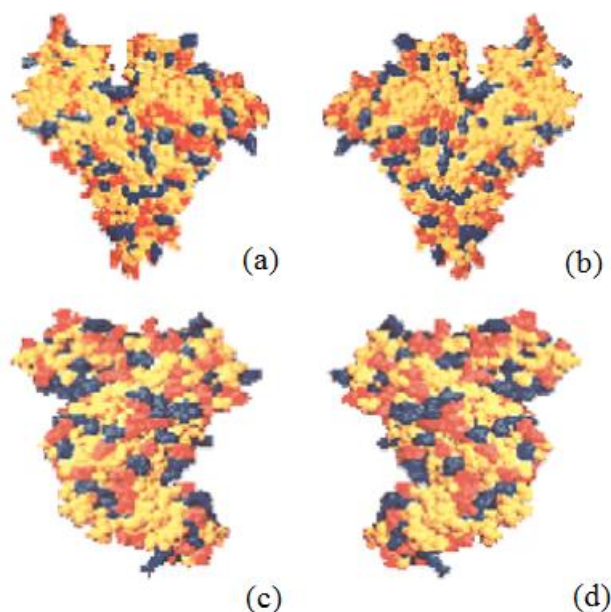
A albumina é usualmente associada a proteínas ou grupo de proteínas, que são caracterizadas por sua solubilidade em água. É fundamental no armazenamento de óxido nítrico, o que resulta em seus grandes processos fisiológicos. Condiz a proteína mais abundante do sistema circulatório, sendo ela responsável pela manutenção da pressão sanguínea. A Tabela 1 aponta as cadeias de aminoácidos presentes na proteína albumina de soro bovino (BSA).

**Tabela 1: Composição da BSA (TORRES, 2006).**

Ala 48	Cys 35	Asp 41	Glu 58
Phe 30	Gly 17	His 16	Ile 15
Lys 60	Leu 65	Met 5	Asn 14
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Ser 32
Thr 34	Val 38	Trp 3	Tyr 21

Sua estrutura é 55% na forma  $\alpha$ -hélice e 45% randômica e suas proteínas não são uniformemente carregadas, conforme o apresentado na Figura 4.

**Figura 4: Estruturas padronizadas da proteína BSA (Adaptado de TORRES, 2006).**



Uma de suas competências é sua tendência de ligação reversível com diversos ligantes. Porém, para que ocorra interação com outros agentes, são necessários padrões de viscosidade, massa molecular, tamanho, volume, forma, carga superficial e deformação, fatores que são fortemente alterados pelo pH, temperatura, força iônica, taxa de cisalhamento e moléculas presentes (TORRES, 2006).

### **3.3. Adsorção**

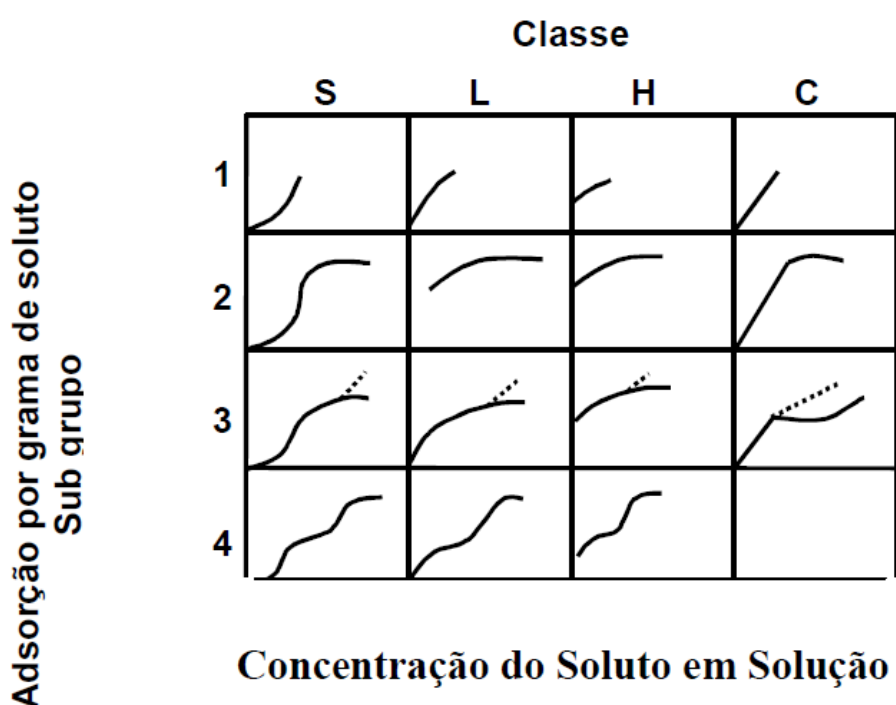
O processo de adsorção ocorre quando moléculas presentes em uma fase fluida retêm-se ao sólido. Este contato pode ser classificado como químico ou físico, variando de acordo com a forma em que as moléculas interagem entre si (TORRES, 2006). Na adsorção física as moléculas se ligam de maneira não covalente, gerando uma força intermolecular de Van der Waals. Portanto, possuem longo alcance e são mais fracas (VASCONCELOS, 2007). Já na adsorção química, as interações são do tipo covalente e os efeitos dessa ligação geralmente ocorrem na superfície do adsorvente.

Durante o estudo da adsorção, conhecer fatores como a cinética e as propriedades de equilíbrio são indispensáveis, isso devido serem essenciais para a determinação do adsorvente e os métodos a serem utilizados (TORRES, 2006).

### 3.4. Modelos de adsorção

A Tabela 2 apresenta os principais modelos que descrevem os processos de adsorção e suas respectivas curvas. O modelo S descreve a adsorção quando as moléculas estão posicionadas verticalmente sobre a superfície do adsorbato. Na classe L, as moléculas são adsorvidas por completo e com forte atração intermolecular. A curva H mostra casos em que ocorre troca iônica. E o exemplo C ocorre quando o soluto penetra no poro facilmente. A tabela também apresenta subgrupos, que descrevem a presença de patamares e aclives (TORRES, 2006).

**Tabela 2: Modelos de adsorção definidos por Giles, 1974 (TORRES, 2006).**



Um dos modelos mais utilizados de isoterma é o de Langmuir (classe L – Tabela 2), que embora possa parecer simples é muito útil para a adsorção de proteínas, pois possui boa precisão.

Este modelo baseia-se no fato de que: a adsorção é limitada a uma monocamada; o interior do sólido tem propriedades homogêneas e o número de sítios é finito; não ocorre interação entre as moléculas adsorvidas; a entalpia de adsorção é igual para todas as moléculas quando referente à adsorção competitiva de compostos diversos.



O modelo matemático que melhor descreve a isoterma de Langmuir pode ser escrito como:

$$q^* = \frac{q_m c^*}{k_d + c^*} \quad (1)$$

Assim tem-se que:

$c^*$  corresponde à concentração de soluto na fase líquida;

$q^*$  é a quantidade de soluto adsorvido por unidade do adsorvente;

$q_m$  é a quantidade máxima adsorvida no estado sólido;

$k_d$  corresponde à constante de dissociação, descrevendo o equilíbrio da reação (ARAÚJO, 1996).

Outro modelo muito utilizado é o de Freundlich. Esta isoterma considera as multicamadas, portanto são úteis para descrever situações em que ocorre a heterogeneidade.

Sua equação é dada por:

$$q = k \cdot C e^{1/n} \quad (2)$$

Onde:

$q$  é a quantidade adsorvida na fase sólida;

$Ce$  corresponde à concentração na fase líquida do equilíbrio;

$k$  e  $n$  são os parâmetros empíricos de Freundlich (valores de  $n$  no intervalo de 1 a 10 indicam condições favoráveis para a adsorção).

Quando comparado ao modelo de Langmuir, esta isoterma é muito versátil, pois fornece bem as informações sobre o equilíbrio de adsorção de um único soluto. Porém, só funciona em um determinado intervalo de concentração (SOARES, 1998).

Em alguns sistemas de adsorção de proteínas, nem todas as considerações dos modelos de Langmuir e de Freundlich são satisfeitas, devido à complexidade dos mecanismos de adsorção das macromoléculas. Isso ocorre devido aos desvios de idealidade destes modelos, que podem ser causadas devido a: adsorção irreversível, provocada pela adsorção da proteína em múltiplos sítios de ligação, levando a uma forte interação com a

matriz; heterogeneidade da superfície da matriz, e cooperatividade entre as proteínas (HUTCHENS et al., 1988).

Contudo, quando estes modelos não representam bem os dados experimentais, pode-se aplicar, entre outros, o modelo híbrido de Langmuir-Freundlich (equação x), uma vez que este leva em conta a heterogeneidade da superfície (adsorvente) e as interações entre proteína-proteína.

$$q^* = \frac{q_m (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (3)$$

em que  $K_d(LF)$  é a constante de dissociação aparente que inclui as contribuições de cooperatividade e  $n$  é o coeficiente de Langmuir-Freundlich. A inclusão do terceiro parâmetro  $n$ , a ser ajustado, permite que esta equação possa representar melhor a natureza heterogênea da adsorção e as interações cooperativas (YANG e CHEN, 2002), uma vez que este coeficiente é classicamente um indicativo do tipo de cooperatividade presente no mecanismo de adsorção. No caso de  $n = 1$ , não há cooperatividade entre as proteínas, ou os sítios são independentes e o modelo de Langmuir-Freundlich se reduz ao modelo de Langmuir. Para  $n > 1$ , uma cooperatividade positiva é sugerida e quando  $0 < n < 1$ , uma cooperatividade negativa é atribuída ao processo (SHARMA e AGARWAL, 2001).

Segundo JOHNSON e ARNOLD (1995a), a adsorção reversível de proteínas pode ser melhor descrita por meio do modelo de isoterma de Temkin. Este modelo assume que o fenômeno de adsorção é caracterizado por uma distribuição uniforme de energias de ligação, até atingir um valor máximo ( $\Delta G_{\max}$ ), da qual resulta a equação y:

$$q^* = q_T \ln(1 + K_T C^*) \quad (4)$$

$$K_T = \exp\left(\frac{\Delta G_{\max}}{RT}\right) \quad (5)$$

em que  $K_T$  é a constante de ligação no equilíbrio, correspondente à máxima energia de ligação (equação z),  $q_T$  é a capacidade de superfície diferencial para a adsorção da proteína por unidade de energia de ligação (mol de proteína por volume de suporte).

Há duas importantes vantagens na utilização da isoterma de Temkin em relação a outros modelos para a adsorção heterogênea de proteínas. Primeiro, para baixas ou moderadas coberturas da superfície do adsorvente, a adsorção é descrita por dois parâmetros fisicamente significantes, os quais podem ser determinados por experimentos de adsorção em

batelada. Segundo, a isoterma de Temkim satisfaz a lei de Henry, que é um pré-requisito necessário para se chegar à teoria do equilíbrio local para predizer o funcionamento cromatográfico a partir de expressões no equilíbrio (JOHNSON e ARNOLD, 1995b).

### 3.5. Termodinâmica da Adsorção

A partir das constantes de dissociação obtidas pelo ajuste dos parâmetros das isotermas de Langmuir e Langmuir-Freundlich, podem ser determinadas as propriedades termodinâmicas da adsorção, como a energia livre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ), a entalpia ( $\Delta H^0$ ) e entropia ( $\Delta S^0$ ) (SMITH e VAN NESS, 1987).

A energia livre de Gibbs pode ser definida pela equação 6:

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln K_d \quad (6)$$

No equilíbrio  $\Delta G = 0$ .

Desta forma,  $\Delta G^0$  pode ser calculado a partir da constante de dissociação a uma dada temperatura, conforme a equação 7. A dependência da temperatura com  $K_d$  é dada pela relação de van't Hoff na forma integrada (equação 7):

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^0}{RT} + J \quad (7)$$

Em que J é a constante de integração. O parâmetro  $\Delta H^0$  pode ser ajustado aos dados por meio desta linearização do modelo de van't Hoff. No caso de haver um comportamento linear entre  $\ln K_d$  e  $1/T$ ,  $\Delta H^0$  é considerado independente da temperatura, na faixa de temperatura estudada. Por sua vez, o parâmetro  $\Delta S^0$  pode ser obtido a partir da relação Gibbs-Helmholtz (equação 8):

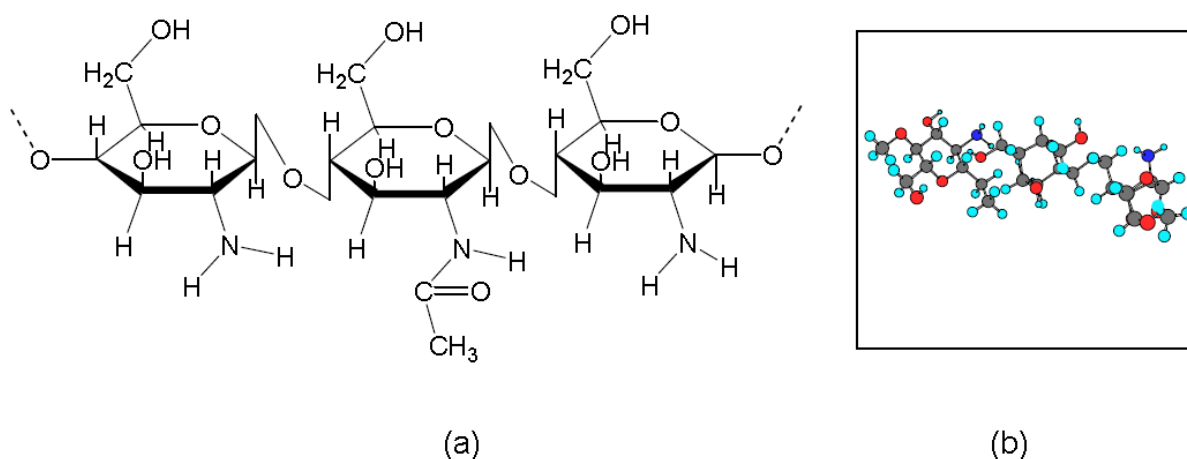
$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (8)$$

### 3.6. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear resultante da substituição parcial dos grupos N-acetil presentes na quitina quando em contato com solução alcalina, resultando em um grau de desacetilação maior ou igual a

50%. Sua natureza química é composta da estrutura 2-amino 2-desoxi-b-D-glicose (poli(Dglicosamina)) e 2-acetamida 2-desoxi-b-D-glicose (N-acetil-D-glicosamina), conforme mostra a Figura 5.

**Figura 5: Estrutura linear (a) e tridimensional (b) da quitosana. (Torres, 2006)**



Devido a sua solubilidade em soluções ácidas é possível analisar as propriedades de seus grupos reativos. Eles são divididos em três: grupo amino, na posição C-2, incubido por sua natureza poliatômica; e duas hidroxilas, sendo uma primária e a outra secundária, nas posições C-3 e C-6.

Dentre a sua usabilidade tem-se a purificação da água, indústria papelreira, alimentícia e de cosméticos, etc. Além disso, também pode ser utilizada nas áreas médica e de fármacos, sendo empregue em lentes de contato, em pele artificial e na regeneração de feridas. Isso, devido às suas características físico-químicas e biológicas.

Sua estrutura varia de acordo com a temperatura, pH, distribuição das massas moleculares e grau de desacetilação e, a partir de alterações em seu arranjo, é possível intensificar sua propriedade hidrofílica (grupo amino) ou hidrofóbica (grupo imino).

Para torna-la mais inerte e resistente ao meio é necessário adicionar um agente modificador, podendo ocorrer de forma direta, onde o modificador é colocado na própria solução de quitosana, ou indireta (heterogênea), que ocorre quando o modificador é adicionado na quitosana já moldada (TORRES, 1996).

### **3.7. Alginato de Sódio**

O alginato é um polissacarídeo constituído pelos ácidos  $\beta$ -D-manurônico e  $\alpha$ -L-glucurônico que interagem entre si por ligações glicosídicas. É usualmente extraído de algas marrons, porém pode ser obtido por águas marinhas no geral. Enquanto na alga possui as seguintes características: prevenção de dessecação, mantimento da integridade celular e fornecer força mecânica à célula.

Quando comparados com os polímeros sintéticos o alginato é mais vantajoso, pois formam hidrogeis em pH e temperatura moderada. Além de ser mais barato e possuir em abundância na natureza. As suas propriedades fornecem vantagens muito úteis para a biomedicina e tratamentos médicos (GONDIM, 2012).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Microesferas de quitosana/alginato epoxiladas: Sintetizadas e gentilmente fornecidas pelo Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção (GPSA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, por meio do Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.

A proteína padrão BSA foi adquirida junto a Sigma (EUA). Sais para o preparo de tampões e soluções são de padrão analítico. A água ultrapura utilizada é obtida em um sistema de purificação MilliQ (Millipore, EUA).

### 4.2. Métodos

Para a determinação da isoterma de adsorção serão utilizadas soluções de BSA de alta pureza. Os experimentos para a obtenção das isotermas de adsorção foram realizados em frascos agitados (tubos eppendorf de capacidade de 1,5 mL), em duas diferentes temperaturas (25° e 35°C), utilizando-se 15 mg de microesferas de quitosana/alginato epoxiladas. Foi utilizado um agitador orbital com temperatura controlada, mantendo-se a agitação em 110 rpm.

Em cada tubo, com as microesferas previamente equilibradas com o tampão de adsorção, foram adicionadas soluções de BSA em concentrações de 0,5 a 20,0 mg mL<sup>-1</sup>. Os frascos foram agitados por três horas, até que o equilíbrio fosse atingido. Após o decorrer deste tempo, o sobrenadante foi recuperado e a quantificação de BSA foi realizada por meio da leitura direta da absorbância a 495 nm. Nesta etapa, foram avaliados os tampões biológicos fosfato de sódio e MOPS em dois pHs diferentes (6,15 e 7,5).

Cada ponto de cada isoterma será obtido como a média de duplicatas. A concentração de albumina será determinada pela leitura direta de absorbância a 485 nm, em espectrofotômetro UV-Vis Evolution 60S, marca Thermo Scientific. A absorbância será convertida em concentração, mediante uma curva analítica (curva de calibração) a ser construída.

Após o tratamento dos dados e obtenção da capacidade de adsorção ( $q^*$ ) e concentração de equilíbrio ( $C^*$ ), foram plotados gráficos de  $q^*$  versus  $C^*$  e os parâmetros dos

modelos das isotermas de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin foram ajustados. Com base nesses modelos, os parâmetros termodinâmicos  $\Delta G_{\text{max}}$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  foram determinados.

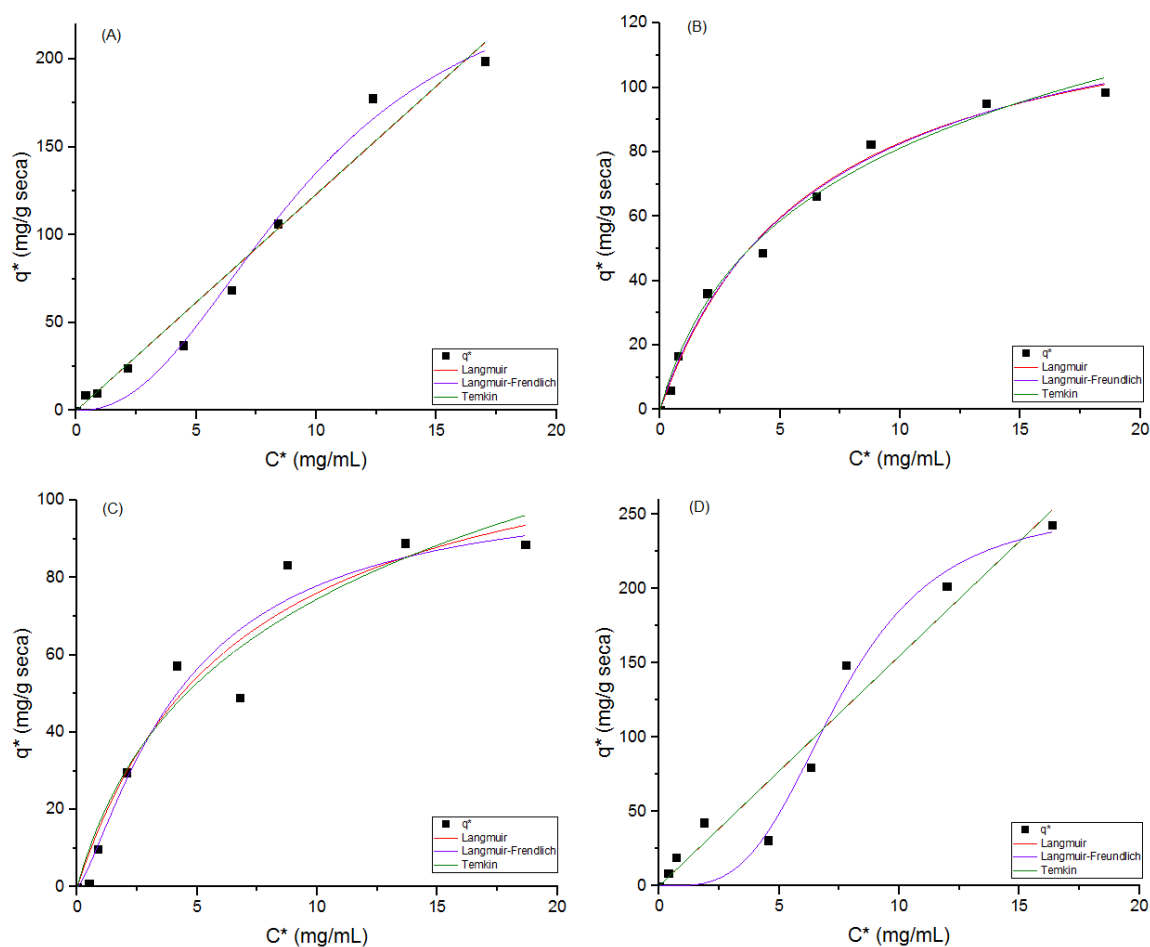
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isotermas de adsorção

Inicialmente, as isotermas de adsorção foram construídas a partir dos valores de concentração de albumina pós-adsorção mensurados pelo método de Bradford. Posteriormente, com o auxílio do software Origin<sup>®</sup>, os dados de cada isoterma foram ajustados por regressão não linear pelos modelos de isotermas de adsorção de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin para as temperaturas de 25°C e 35°C, em tampão fosfato e MOPS, e pH = 6,15 e 7,5.

As isotermas de adsorção e as curvas do ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin para os experimentos com tampão biológico fosfato de sódio são apresentadas na Figura 6.

**Figura 6: Isotermas de adsorção de albumina em tampão biológico fosfato de sódio em pH 6,15 e T=25°C (A), pH 6,15 e T=35°C (B), pH 7,5 e T=25°C (C) e pH 7,5 e T=35°C (D).**





Os valores de capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ), constante de adsorção ( $K_d$ ), constante de dissociação aparente  $K_{d(LF)}$ , coeficiente de Langmuir-Freundlich ( $n$ ) e constante de ligação no equilíbrio ( $K_T$ ) obtidos por regressão não linear pelos modelos de isotermas de adsorção de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin para os experimentos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin aos dados de adsorção de albumina humana em matriz de quitosana/alginato e tampão fosfato de sódio.**

Temperatura		25°C		35°C	
pH		6,15	7,5	6,15	7,5
Langmuir	$q_m$	$4,69 \times 10^6 \pm 1,94 \times 10^{10}$	$127,27 \pm 20,20$	$135,52 \pm 8,10$	$150131,47 \pm 2,2 \times 10^7$
	$K_d (10^{-4} \text{ mol/L})$	$57806,25 \pm 240901515,15$	$1,01 \pm 0,38$	$0,96 \pm 0,14$	$1469,60 \pm 219395,45$
	$R^2$	0,97235	0,95013	0,99181	0,94863
Langmuir - Freundlich	$q_m$	$263,31 \pm 50,28$	$104,32 \pm 21,34$	$141,34 \pm 23,16$	$253,71 \pm 35,81$
	$K_{d(FL)} (10^{-4} \text{ mol/L})$	$25,39 \pm 20,47$	$1,08 \pm 0,47$	$0,97 \pm 0,16$	$177,23 \pm 430,14$
	$n$	$2,24 \pm 0,52$	$1,32 \pm 0,45$	$0,95 \pm 0,14$	$3,50 \pm 1,35$
	$R^2$	0,98595	0,95553	0,99194	0,96032
Temkin	$q_T$	$24898,83 \pm 1,08 \times 10^6$	$39,19 \pm 11,16$	$39,32 \pm 4,24$	$23779,16 \pm 1,11 \times 10^6$
	$K_T (\text{L/mol})$	$32,77 \pm 1430,88$	$37566,54 \pm 23546,82$	$45429,78 \pm 11297,88$	$43,082 \pm 2020,26$
	$R^2$	0,97233	0,94333	0,99041	0,94863

De maneira geral as isotermas apresentaram comportamento não linear e todos os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) próximos a 1,0. As exceções são os modelos de Langmuir e Temkin ajustado para os ensaios a 25°C e pH 6,15, e 35°C pH 7,5. Nesses casos, como observado na Figura 6, os modelos não se adaptaram bem aos dados. Isso fica evidente ao observar os valores de  $q_m$ ,  $K_{d(LF)}$ , e  $K_T$  da Tabela 3, em que o erro é maior que o próprio parâmetro.

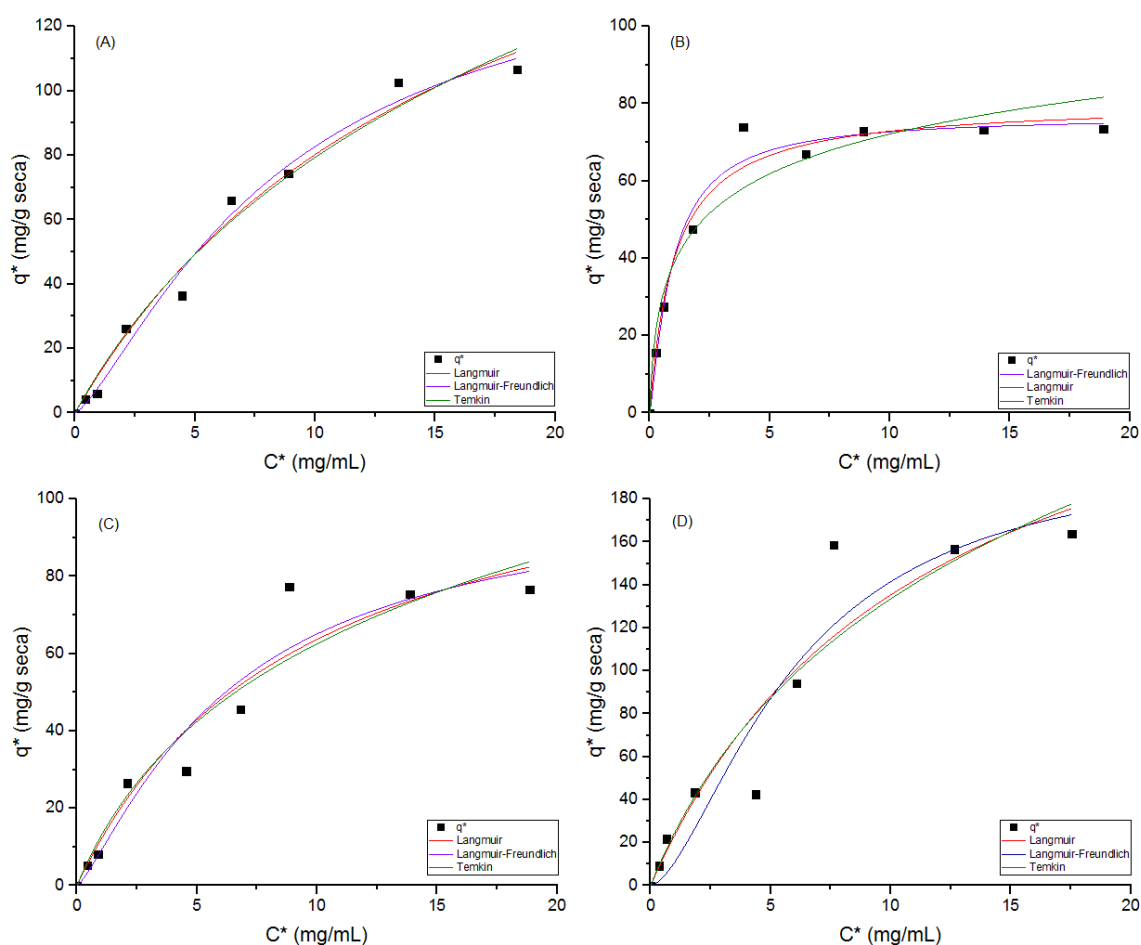
Como observado na Figura 6, os modelos de Langmuir e Temkin não representam de maneira adequada os dados experimentais. O modelo de Langmuir considera um sistema ideal em que a superfície do sólido é coberta por um número de sítios fixos e com energia equivalente, sendo que cada sítio pode ser ocupado por uma molécula adsorvida, considera-se que as moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras e a adsorção completa-se quando todos os sítios forem ocupados, correspondendo a uma monocamada de adsorbato. Já o modelo de Temkin baseia-se no fato do calor de adsorção ou termo de afinidade do íon pela superfície adsorvente decrescer, linearmente, com o aumento do recobrimento da superfície adsorptiva.

Desta forma, o modelo que melhor descreve os dados é o de Langmuir-Freundlich, que leva em conta a heterogeneidade da superfície (adsorvente) e as interações entre proteína-proteína. O coeficiente de Langmuir-Freundlich indica o tipo de cooperatividade presente no mecanismo de adsorção. Na maioria dos casos  $n > 1$ , indicando que há cooperatividade positiva, e no caso de  $0 < n < 1$ , no ensaio a  $35^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} = 6,15$ , uma cooperatividade negativa.

Para o  $\text{pH}$  de 6,15 houve uma queda no valor de  $q_m$  com o aumento de temperatura, e para o  $\text{pH}$  de 7,5 houve um aumento no valor de  $q_m$  com o aumento de temperatura.

As isotermas de adsorção e as curvas do ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin para os experimentos com tampão MOPS são apresentadas na Figura 7.

**Figura 7: Isotermas de adsorção de albumina em tampão MOPS em  $\text{pH}$  6,15 e  $T=25^{\circ}\text{C}$  (A),  $\text{pH}$  6,15 e  $T=35^{\circ}\text{C}$  (B),  $\text{pH}$  7,5 e  $T=25^{\circ}\text{C}$  (C) e  $\text{pH}$  7,5 e  $T=35^{\circ}\text{C}$  (D).**



Os valores de capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ), constante de adsorção ( $K_d$ ), constante de dissociação aparente  $K_{d(LF)}$ , coeficiente de Langmuir-Freundlich ( $n$ ) e constante de ligação no equilíbrio ( $K_T$ ) obtidos por regressão não linear pelos modelos de isothermas de adsorção de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin para os ensaios estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin aos dados de adsorção de albumina humana em matriz de quitosana/alginate e tampão MOPS.**

Temperatura		25°C		35°C	
pH		6,15	7,5	6,15	7,5
Langmuir	$q_m$	$211,91 \pm 34,60$	$123,37 \pm 27,15$	$80,43 \pm 3,16$	$289,76 \pm 94,29$
	$K_d (10^{-4} \text{ mol/L})$	$2,48 \pm 0,69$	$1,41 \pm 0,66$	$0,15 \pm 0,03$	$1,72 \pm 1,06$
	$R^2$	0,9842	0,93607	0,97884	0,90539
Langmuir - Freundlich	$q_m$	$149,81 \pm 29,72$	$102,00 \pm 34,24$	$76,84 \pm 4,11$	$203,24 \pm 67,14$
	$K_{d(FL)} (10^{-4} \text{ mol/L})$	$2,59 \pm 0,67$	$1,57 \pm 0,83$	$0,14 \pm 0,03$	$2,68 \pm 2,83$
	$n$	$1,32 \pm 0,26$	$1,26 \pm 0,53$	$1,21 \pm 0,23$	$1,60 \pm 0,89$
	$R^2$	0,98781	0,93896	0,98197	0,91045
Temkin	$q_T$	$79,06 \pm 19,16$	$40,03 \pm 14,36$	$15,04 \pm 2,47$	$100,29 \pm 49,80$
	$K_T (\text{L/mol})$	$11396,22 \pm 4534,86$	$24879,36 \pm 17827,26$	$791128,14 \pm 550162,14$	$18379,02 \pm 16562,7$
	$R^2$	0,98213	0,93066	0,94125	0,90094

No caso dos experimentos realizados com MOPS todas as isothermas apresentaram comportamento não linear e todos os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) próximos a 1,0. De maneira análoga, o modelo Langmuir-Freundlich foi o que melhor representou os dados experimentais. Isso fica evidente ao observarmos os valores de  $R^2$  da Tabela 4, os quais têm os maiores valores nos ajustes do modelo de Langmuir-Freundlich.

## 5.2. Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos foram determinados utilizando os valores dos parâmetros de adsorção obtidos pelo ajuste não linear segundo o modelo de Langmuir-Freundlich. O cálculo da energia livre de Gibbs ( $\Delta G_{\max}$ ), foi feito a partir da Equação 6, considerando que no equilíbrio  $\Delta G = 0$ . Os valores são apresentados na Tabela 5.

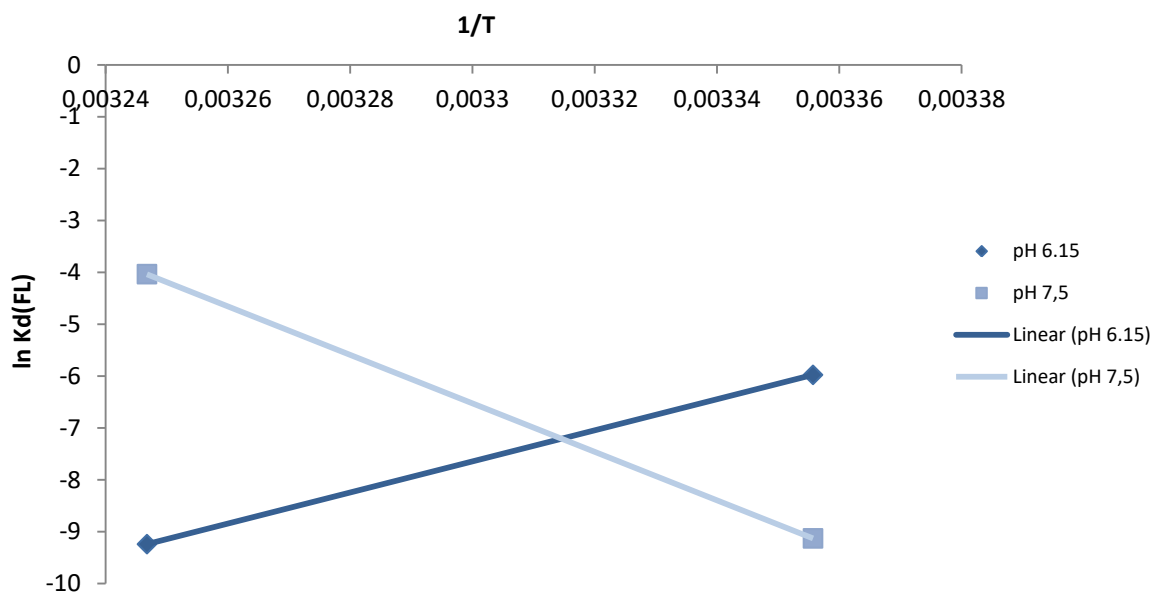
**Tabela 5: Valores de  $\Delta G_{\max}$  para a adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato para os tampões MOPS e fosfato de sódio.**

Temperatura		25°C		35°C	
pH		6,15	7,5	6,15	7,5
Fosfato	$\Delta G_{\max}$ (kJ/mol)	-14.806	-22.618	-23.662	-10.328
MOPS	$\Delta G_{\max}$ (kJ/mol)	-20.462	-21.701	-28.603	-21.057

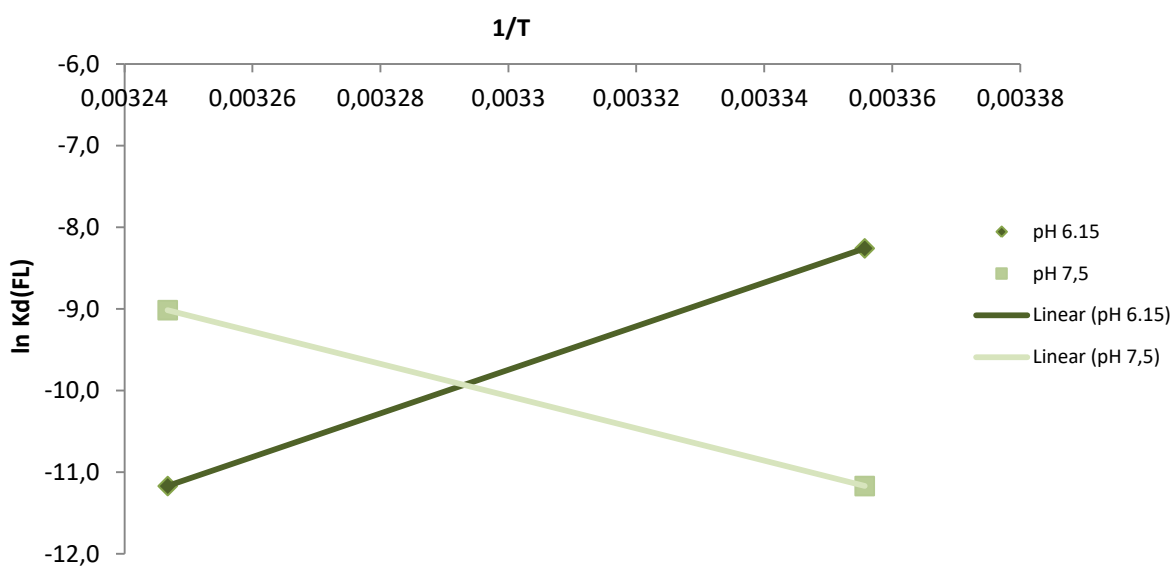
Os valores de  $\Delta G_{\max}$  obtidos foram negativos indicando que o processo é favorável para adsorção, ou seja, é espontâneo. Comparando-se os valores de  $\Delta G_{\max}$  das diferentes condições experimentais, nota-se que para os experimentos feitos em pH 6,15 há um aumento do valor de  $\Delta G_{\max}$  com o aumento da temperatura, e para os experimentos feitos em pH 7,5 o comportamento inverso ocorre, o valor de  $\Delta G_{\max}$  diminui com o aumento da temperatura. Comparando-se os dois tampões, de maneira geral, os ensaios realizados com MOPS são os que tiveram maiores valores de  $\Delta G_{\max}$ .

Os valores de entalpia ( $\Delta H$ ) foram obtidos pela equação de Van't Hoff linearizada, construindo-se o gráfico de  $\ln(K_{d(FL)})$  em função de  $1/T$ , no qual o coeficiente angular da reta fornece os valores de  $\Delta H^\circ$ , segundo a Equação 7. As Figuras 8 e 9 apresentam os gráficos de Van't Hoff para a adsorção de albumina em fosfato e MOPS.

**Figura 8: Gráfico de Van't Hoff para adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginate utilizando tampão fosfato de sódio.**



**Figura 9: Gráfico de Van't Hoff para adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginate utilizando tampão MOPS.**



Conforme mostrado na Equação 7, a variação de entalpia pode ser determinada a partir do coeficiente angular da reta, multiplicando-o pela constante universal dos gases. A Tabela 6 traz os valores de  $\Delta H^0$  para a adsorção em pH 6,15 e 7,5 para os diferentes tipos de tampões.

**Tabela 6: Valores de  $\Delta H^\circ$  para a adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato para os tampões MOPS e fosfato de sódio.**

		$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)
<b>Fosfato</b>	pH 6,15	249
	pH 7,5	-389
<b>MOPS</b>	pH 6,15	222
	pH 7,5	-41

Sabendo-se os valores de  $\Delta G^\circ$  e  $\Delta H^\circ$ , foi possível determinar a entropia dos sistemas a partir da Equação 8. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7: Valores de  $\Delta S$  para a adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato para os tampões MOPS e fosfato de sódio.**

Temperatura		25°C		35°C	
pH		6,15	7,5	6,15	7,5
<b>Fosfato</b>	$\Delta S$ (kJ/mol)	51	77	76	32
<b>MOPS</b>	$\Delta S$ (kJ/mol)	69	74	93	68

Os valores de  $\Delta S^\circ$  encontrados foram todos positivos, indicando um aumento na desordem total do sistema durante a adsorção.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelos experimentos de adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato mostrou que o tampão fosfato apresentou valores de capacidade máxima de adsorção mais significantes do que os valores obtidos nos experimentos com MOPS. A influência da temperatura no processo de adsorção estava diretamente relacionada com o pH. Para o pH mais ácido houve uma queda no valor da capacidade máxima de adsorção com o aumento de temperatura, e para valores maiores de pH houve um aumento no valor da capacidade máxima de adsorção com o aumento de temperatura.

A partir do ajuste dos parâmetros de adsorção pelos modelos de isotermas aplicados foi possível verificar que, possivelmente, há formação de multicamada durante o processo de adsorção, o que aumenta a capacidade de adsorção. Além disso, a determinação dos parâmetros termodinâmicos mostrou o quanto o processo de adsorção de albumina em matriz de quitosana/alginato é espontâneo.

Como sugestões para trabalhos futuros, pode-se citar o planejamento de experimentos com uma maior quantidade de concentrações analisadas, a fim de minimizar os erros, e que avaliem a performance do adsorvente quando aplicado a um cromatógrafo. Além disso, é recomendável fazer as análises em outras faixas de temperatura e pH para melhor avaliar a dependência da adsorção em relação a esses parâmetros.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARAUJO, Mariana de Oliveira Dias. Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons. 1996. 85f. Faculdade de Engenharia Química – Área de Concentração Engenharia de Processos/Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- [2] GONDIN, Diego Romão. Quitosana/Alginato epoxilado com corantes imobilizados como potencial fase estacionária para purificação de IgG do soro humano. 2012. 100f. Pós-graduação em Engenharia Química – Centro de Tecnologia/Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- [3] HUTCHENS, T. W.; YIP, T. T.; PORATH, J. Protein interaction of immobilized ligands: Quantitative analyses of equilibrium partition data and comparison with analytical chromatography approaches using immobilized metal affinity adsorbents. *Analytical Biochemistry*, v. 170, p. 168-182, 1988.
- [4] JOHNSON, R. D.; ARNOLD, F. H. The Temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1247, p. 293-297, 1995a.
- [5] SOARES, José Luciano. Remoção de corantes têxteis por adsorção em carvão mineral ativado com alto teor de cinzas. 1998. 99f. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina.
- [6] SHARMA, S.; AGARWAL, G.P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. *Analytical Biochemistry*, v. 288, p. 126-140, 2001a
- [7] Smith, J. M.; Van Ness, H. C. Introduction to chemical engineering thermodynamics. New York, McGraw-Hill, 4ª edição, 698p, 1987.
- [8] TORRES, Marco Antonio. Produção e caracterização de microesferas de Quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima. 2006. 123f. Faculdade de Engenharia Química – Área de Concentração Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos/Universidade Estadual de Campinas, Campinas.



- [9] VASCONCELOS, Cláudio Lopes de. Obtenção de dispersões de complexo polieletrólitos à base de quitosana e poli(ácido metacrílico) e análise de adsorção de albumina sérica. 2007. 99f. Departamento de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- [10] YANG, L.; CHEN, P. Chitosan coarse filter paper composite membrane for fast purification of IgG from human serum. *Journal of Membrane Science*, v. 205, p. 141-153, 2002.